

## NEW PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE

Publication number: JP9227549

Publication date: 1997-09-02

Inventor: WAKABAYASHI TOSHIKI; KAGEYAMA REINA;  
NARUSE YASUAKI; YOKOYAMA YUMI; WATANABE  
YOSHIO; DOBASHI KAZUYUKI

Applicant: MERCIAN CORP; EISAI CO LTD

Classification:

- International: C12P17/08; A61K31/365; A61P9/10; A61P27/02;  
A61P29/00; A61P35/00; A61P43/00; C07D313/00;  
C12R1/465; C12P17/02; A61K31/365; A61P9/00;  
A61P27/00; A61P29/00; A61P35/00; A61P43/00;  
C07D313/00; (IPC1-7): C07D313/00; A61K31/365;  
C12P17/08; C12P17/02; C12R1/465; C07M9/00

- European:

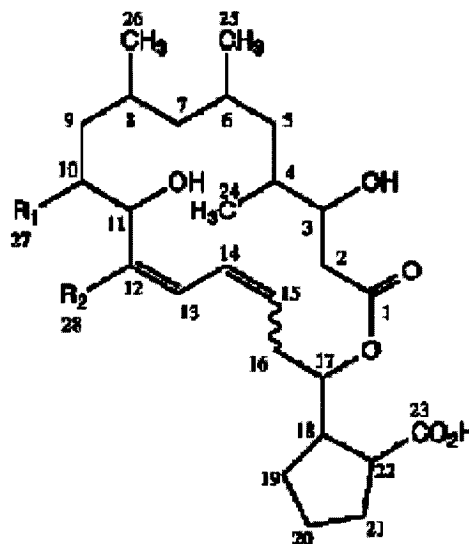
Application number: JP19960035082 19960222

Priority number(s): JP19960035082 19960222

Report a data error here

### Abstract of JP9227549

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new compound useful for preventing and treating various diseases followed by abnormal proliferation of vascularization. **SOLUTION:** This compound is shown by formula I (R<sub>1</sub> is H or a lower alkyl; R<sub>2</sub> is cyano or carboxyl), its salt or its hydrate. The compound is obtained by culturing a bacterium belonging to the genus *Streptomyces* such as *Streptomyces rochei* Mer-N7167 (FERM P-14670) in a nutrient medium, subjecting the culture solution to clarifying filtration, extracting the solution with a solvent (e.g. butanol), concentrating the organic solvent layer under reduced pressure, extracting the concentrated solution with methanol and purifying the extract by chromatography, etc. The compound is effective for rheumatic arthritis, solid carcinoma, atherosclerosis, diabetic retinopathy, hemangioma, psoriasis, etc. A daily dose is 1-100mg per adult and administered once to several time dividedly.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-227549

(43) 公開日 平成9年(1997)9月2日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 313/00			C 0 7 D 313/00	
A 6 1 K 31/365	ABG		A 6 1 K 31/365	ABG
	ABL			ABL
	ABX			ABX
	ADU			ADU
審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 13 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平8-35082

(22) 出願日 平成8年(1996)2月22日

(71) 出願人 000001915

メルシャン株式会社

東京都中央区京橋1丁目5番8号

(71) 出願人 000000217

エーザイ株式会社

東京都文京区小石川4丁目6番10号

(72) 発明者 若林 利明

茨城県つくば市下広岡668-36

(72) 発明者 藤山 礼奈

茨城県つくば市稲荷前9-7-503

(72) 発明者 成瀬 庸彰

茨城県牛久市南7-55-5

(74) 代理人 弁理士 古谷 馨 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新生理活性物質

(57) 【要約】

【課題】 新規血管新生阻害物質を提供することにある。

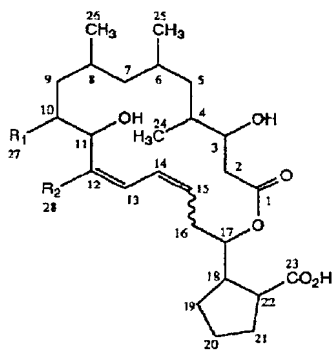
【解決手段】 Streptomyces系微生物の培養液を原料として、血管新生阻害物質をスクリーニングし精製した結果、ボレリジン (Borrelidin) の類縁化合物4種を単離、構造確認した。

【効果】 血管新生の異常増殖を伴う各種疾患の予防および治療剤として期待される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(I)で表される化合物、その塩またはその水和物。

## 【化1】



(I)

(式中、 $R_1$  は水素原子または低級アルキル基、 $R_2$  はシアノ基またはカルボキシル基を意味する。)

【請求項2】 一般式(I)において、 $R_1$  がメチル基、 $R_2$  がシアノ基であり、12Z、14Eの立体配置を有する請求項1に記載の化合物、その塩またはその水和物。

【請求項3】 一般式(I)において、 $R_1$  がメチル基、 $R_2$  がシアノ基であり、12Z、14Zの立体配置を有する請求項1に記載の化合物、その塩またはその水和物。

【請求項4】 一般式(I)において、 $R_1$  が水素原子、 $R_2$  がシアノ基であり、12Z、14Eの立体配置を有する請求項1に記載の化合物、その塩またはその水和物。

【請求項5】 一般式(I)において、 $R_1$  がメチル基、 $R_2$  がカルボキシル基であり、12Z、14Eの立体配置を有する請求項1に記載の化合物、その塩またはその水和物。

【請求項6】 請求項1ないし5のいずれか一項に記載の化合物、その塩またはその水和物を有効成分とする医薬。

【請求項7】 ストレプトミセス・ロチェイ (*Streptomyces rochei* Mer-N7167 (FERM P-14670)) を栄養培地中で培養し、その培養液から請求項1ないし5のいずれか一項に記載の化合物、その塩またはその水和物を採取することを特徴とする請求項1ないし5のいずれか一項に記載の化合物、その塩またはその水和物の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は血管新生の異常増殖を伴う各種疾患に対する予防および治療に有効な新規生理活性物質に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 血管新生は胎児期の血管樹形成や各臓器の形態的、機能的発達時に不可欠な生物学的現象であるが、成熟個体では女性性周期においてのみに生じる。し

かし成熟個体において、血管新生の病的増加が様々な疾患の発症あるいは進行過程に関与していることが知られている。具体的には癌、リウマチ性関節炎、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜症、血管腫、乾せんなどが血管新生の異常を伴う疾患として挙げられる (Marsha A. et al., *Biotechnology*, 9, 630, 1991)。特に固形癌の増殖は血管新生に依存することが報告されていることから (Folkman J., *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 4, 1990) 血管新生阻害剤は難治性固形癌に対する新しい治療薬になると期待されている。

【0003】 これまでいくつかの血管新生阻害物質に関する報告はあるが、いまだ実用化に耐える有効な物質は見出されていない (公開特許公報 平3-109324号、公開特許公報 平3-236324号、公開特許公報 平3-2184号)。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の課題は、血管新生阻害活性を有する新規物質を単離し、血管新生の異常増殖を伴う各種疾患に対する予防および治療剤を提供することにある。

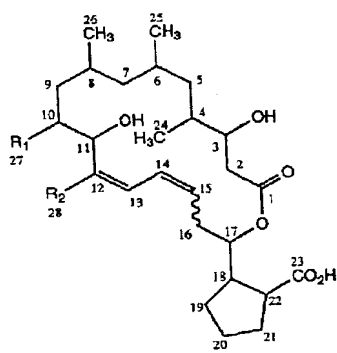
## 【0005】

【課題を解決するための手段】 上記現状に鑑み、本発明者らは微生物培養液を原料として、阻害活性がより強力で副作用の少ない新しい血管新生阻害物質の探索スクリーニングを開始した。その結果、ストレプトミセス属に属する微生物の培養液中に血管新生阻害物質が産生されることを見出し、この活性物質を単離、構造解析の結果、ボレリジンであることが判明した。この物質の精製過程において、フォトダイオードアレイ検出器を用いるHPLC分析の結果、ボレリジンと同一の紫外吸収スペクトルを示す4種のピークを確認した。これら化合物を単離、構造決定の結果、新規物質であり血管新生阻害活性を有することを確認し、本発明を完成するに至った。

【0006】 すなわち本発明は、一般式(I)で表される化合物、その塩またはその水和物、及びそれらの製造方法、並びにそれらを有効成分とする医薬に関するものである。

## 【0007】

## 【化2】



(I)

【0008】(式中、 $R_1$  は水素原子または低級アルキル基、 $R_2$  はシアノ基またはカルボキシ基を意味する。)

より具体的には、一般式(I)において、 $R_1$  がメチル基、 $R_2$  がシアノ基であり、12Z、14Eの立体配置を有する化合物(II)、 $R_1$  がメチル基、 $R_2$  がシアノ基であり、12Z、14Zの立体配置を有する化合物(III)、 $R_1$  が水素原子、 $R_2$  がシアノ基であり、12Z、14Eの立体配置を有する化合物(IV)、 $R_1$  がメチル基、 $R_2$  がカルボキシ基であり、12Z、14Eの立体配置を有する化合物(V)、それらの塩またはそれらの水和物、及びこれら化合物の製造方法、並びにこれら化合物を有効成分とする、血管新生の異常増殖を伴う各種疾患に対する予防および治療剤等として有効な医薬に関する。

【0009】これら化合物はボレリジンの類縁化合物であって、ボレリジンはストレプトミセス属の微生物の培養液から抗生物質として1949年単離構造決定された化合物である(Berger J. et al., Arch. Biochem. Biophys., 22, 476, 1949)。

#### 【0010】

【発明の実施の形態】本発明化合物の抽出原料である微生物培養液の微生物種としては、ストレプトミセス属を選び、*Streptomyces albobinaceus*, *Streptomyces rochei* および *Streptomyces* sp. C 2989 などボレリジンを産生するいずれの微生物も使用することができる(Singh S.K. et al., Antimicrob. Agents. Chemother. 27, 239, 1985; Berger J., et al., Arch. Biochem. Biophys., 22, 476, 1949; Lumb M. et al., Nature, 206, 263, 1965)。その例として、例えばストレプトミセス・ロチェイ (*Streptomyces rochei*) ATCC 10739などが挙げられるが、特にボレリジンの生産力が高く好適な菌株として本発明者等が石垣島の土壌より分離した放線菌 Mer-N7167株が挙げられる。本菌株は以下の菌学的性質を有する。

【0011】形態：分岐し良く伸長する基生菌糸と、同じく良く伸長する気中菌糸とからなり、気中菌糸の先端は胞子化する。胞子鎖は10~50個連なり、ゆるやかなラセン状を呈するが、曲状のものも見られる。胞子の表面は平滑で大きさは直径  $1\mu\text{m} \times 1\sim 2\mu\text{m}$  程度である。

【0012】菌体成分：ジアミノピメルン酸としては、LL-型を含み、糖はガラクトース、グルコース、マンノース、リボースを含む。

#### 【0013】各種培地上での生育：

ISP-1 生育は中程度で、薄く白色の気中菌糸を産する。培養裏面はわずかに黄色になる。

ISP-2 生育は良好で、白色の気中菌糸上に灰色ないし灰白色 (light grayishreddish brown) の胞子を多量に産する。培養裏面はわずかに黄褐色を呈する。

ISP-3 生育は良好で、胞子の色は灰紫色 (Grayish purple)、他はISP-2と同様。

ISP-4 胞子の色は灰色 (Medium gray) 他はISP-2と同様。

ISP-5 生育は弱く、白色の気中菌糸を少し産する。  
改変チロシン培地 メラニン色素は産生しない。なお、いずれの培地でも可溶性色素はほとんど見られない。

#### 【0014】糖資化性：

(+) グルコース、イノシトール、フラクトース、ラムノース、マンノース、アラビノース

(±) キシロース

(-) ラフィノース、シュクロース

(+)；良く資化する (-)；資化しない (±)；

その中間

同定；本株の性状を同時に実施した *Streptomyces rochei* type strain IF0 12908の性状と比較すると、表1に示すような相違点が見られる。

#### 【0015】

【表1】

	N 7167	IFO 12908
胞子鎖長	10~50、50以上は見られない。	10~50、50以上もまれに見られる。
コロニー色	ISP-2、3、4で灰色系色	ISP-2、4で灰色系色
可溶性色素	ほとんど見られない。	ISP-3でわずかに見られる。

【0016】このような相違はあるものの種が異なるほどの差ではなく、ストレプトミセス・ロチェイ (*Streptomyces rochei*) の種内変動の範囲であるので、本発明者らは本菌株をストレプトミセス・ロチェイ (*Streptomyces rochei*) Mer-N7167と命名した。なお、本菌株は、平成6年11月28日付けで工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM P-14670 として寄託されている。

【0017】血管新生阻害活性のスクリーニング法として、ラット大動脈片をコラーゲンゲル内にて培養した場合に観察される管腔形成の阻害度を指標とした (*Nicosia R.F., Lab. Invest., 63, 115, 1990*)。また、血管内皮細胞に対する増殖抑制作用及びスレオニン tRNA 合成酵素阻害活性をも測定した。

【0018】ストレプトミセス属の微生物を通常の適切な培養条件にて培養後、培養液を清澄濾過したのちブタノールまたはメチルイソブチルケトンなどの有機溶媒を加え抽出し、有機溶媒層を減圧下濃縮する。次いでメタノールにて抽出し、石油エーテル (light petroleum) などで処理し粗抽出物を得る。次いでシリカゲルなどを用いる吸着クロマトグラフィー、LH-20 ゲルクロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィーなどを適宜利用して分画し、活性スクリーニングにより活性画分を確認する。上記手法を適宜組み合わせることにより活性物質を単離することができる。吸着クロマトグラフィーに使用する溶媒としては、クロロホルム、メタノール、アセトン、ヘキサン、トルエンなど通常使用される有機溶媒を用い、適宜濃度を選択、組み合わせ使用することができる。結晶化の溶媒としてはクロロホルムとヘキサン、アセトン、四塩化炭素などの組み合わせを適宜選択して用いることができる。一つの手法として M. Lumbらの方法がある (*Nature, 206, 263, 1965*)。単離した化合物の構造解析は、元素分析、GC-MS、NMR、融点、紫外・赤外吸収スペクトルなど常法の手法によって行うことができる。

【0019】本発明化合物は強力な血管新生阻害活性を有することから、異常な血管新生が観察されている疾患、例えばリウマチ性関節炎、固形癌、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜症、血管腫、乾せんなどの予防

剤として、また治療薬として期待されるものである。

【0020】該化合物を各種疾患治療・予防剤として投与する場合、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤などとして経口的に投与してもよいし、また噴霧剤、坐剤、注射剤、外用剤、点滴剤として非経口的に投与してもよい。投与量は症状の程度、年齢、肝疾患の種類などにより著しく異なるが、通常成人1日当たり約1mg~100mgを1日1~数回にわけて投与する。

【0021】製剤化の際は通常の製剤担体を用い、常法により製造する。すなわち、経口用固形製剤を調製する場合は、主薬に賦形剤、更に必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤などを加えた後、常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤などとする。これらの錠剤、顆粒剤には糖衣、ゼラチン衣、その他必要により適宜コーティングすることは勿論差し支えない。注射剤を調製する場合には、主薬に必要によりpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤などを添加し、常法により皮下、筋肉内、静脈内用注射剤とする。

【0022】

【実施例】以下の実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、例中の％は特記しない限り重量基準である。

【0023】実施例1. 精製方法

種培地として、グリセロール 2.0%、グルコース 2.0%、大豆粉 2.0%、酵母エキス0.5%、塩化ナトリウム 0.25%、炭酸カルシウム0.32%及び微量金属溶液 (硫酸銅0.25%、塩化マンガン0.25%及び硫酸亜鉛0.25%の溶液を予め調製) 0.2%の組成からなる培地を用いた。生産培地としては、種培地のグリセロール 2.0%のかわりにポテト澱粉 2.0%とし、他の組成は同じものを用いた。ジャー培養に際しては、消泡剤0.05%を添加した。殺菌前pHを7.4に調整して使用した。前記の種培地 100mlを分注した 500ml容三角フラスコを 120℃で15分間殺菌し、これにMer-N 7167株の斜面寒天培養の1白金耳を接種し、28℃で3日間振盪培養して種培養とした。生産培地15Lを、各30L容ジャー・フェーマンター2基に分注して 120℃、20分間殺菌し、種培養を各 100mlずつ接種し、28℃で5日間通気 (0.5vvm)、攪拌 (300rpm) 培養した。培養終了後遠心分離して上清を集め、pH7に調

整して、ダイヤイオンHP-20（三菱化成社製）3Lに吸着させ、カラムに充填し、水洗浄、20%メタノール洗浄後、80%アセトンで溶出させた。溶出液約3Lを、減圧下で濃縮してアセトンを除去し、水を加えて約1Lにして、酢酸エチル1Lで2回抽出した。抽出液を減圧下で濃縮乾固し、黒褐色の油状物質を得た。この油状物質を少量のメタノールに溶解し、セファデックス LH-20（ファルマシア・バイオテック社製）カラム（400ml）の上部に載せ、メタノールで展開し、活性画分を濃縮乾固した。次に少量のクロロホルム：メタノール=50：1に溶解し、シリカゲル60（メルク社製）カラム（150ml）の上部に載せ、クロロホルム：メタノール=50：1、20：1及び10：1、各500mlで溶出させた。クロロホルム：メタノール=50：1～20：1で溶出される活性画分を集め、濃縮乾固した。次に少量のアセトンに溶解し、少量のシリカゲル60と混ぜ、減圧下で濃縮乾固させ、シリカゲル60カラム（150ml）の上部に載せ、ヘキサン：アセトン=3：1、2：1及び1：2、各500mlで溶出させた。ヘキサン：アセトン=3：1～2：1で溶出される活性画分を集め、減圧下濃縮乾固した。この試料を少量のトルエン：アセトン=5：1に溶解し、シリカゲル60カラム（50ml）の上部に載せ、トルエン：アセトン=5：1、4：1及び2：1、各200mlで溶出させた。トルエン：アセトン=5：1で溶出される活性画分を集め、減圧下濃縮乾固した。この試料をCOSMOSIL 3C<sub>18</sub>カラム（3μm、4.6x100mm）、フォトダイオードアレイ検出器を用いて分析したところ、図1に示すように、ボレリジンと同一紫外吸収スペクトルを示す3種のピーク（それぞれP-1、P-2、P-3と記す。）を確認した（移動相：アセトニトリル：10mMりん酸二水素カリウム緩衝液、pH3.5=1：1、イソクラティック溶出、1ml/min、OD<sub>254nm</sub>）。なお、図1のメインピークはボレリジンである。

#### 【0024】実施例2 P-1およびP-2の精製と構造決定

Mer-N7167株のタンク培養液170Lを遠心分離して上清140Lを得、これをpH7に調整してダイヤイオンHP-207Lに吸着させた。HP-20樹脂を集めカラムに充填し水洗後、80%アセトン水、20Lで溶出した。溶出液を減圧下濃縮してアセトンを留去し、水を加えて4Lにして、酢酸エチル4Lで2回抽出した。酢酸エチル相を併せ減圧下濃縮乾固し、黒褐色油状物質27gを得た。この油状物質をメタノールで調製したセファデックスLH-20カラムに付し、メタノールで展開し、TLC（メルク社製シリカゲル60、No.5715、展開溶媒：クロロホルム：メタノール=9：1、硫酸発色、Rf値0.42）にてモニターしな

がら、ボレリジンを含む画分を集め濃縮乾固した。得られた試料をシリカゲル60（750ml）のカラムに吸着させ、クロロホルム2Lで洗浄後、クロロホルム：メタノール=49：1および19：1、各2.5Lで溶出し、ボレリジンを含む画分を集め濃縮乾固した。得られた試料を更にシリカゲル60（750ml）のカラムに吸着させ、ヘキサン：アセトン=4：1、2Lで洗浄後、同じく7：3の混合溶媒で溶出した。ボレリジンを含む画分を集め濃縮乾固し、5.95gの精製物を得た。生物活性を示すこの精製物をクロロホルム-ヘキサンの混合溶媒から結晶化し、ボレリジンの無色針状結晶4.29gを得た。母液を濃縮乾固し（1.58g）、少量のジメチルスルホキシドに溶解した後、アセトニトリル：10mMりん酸二水素カリウム緩衝液（pH3.5）=2：3であらかじめ緩衝化しておいたYMC-GEL ODS-AM 120-S50（YMC社製、600ml）のカラムに付した。同じ組成の混合溶媒2Lで洗浄後、9：11さらに1：1の組成の混合溶媒各2Lで溶出し、溶出液をHPLCでモニターしながら、ボレリジンを純粋に含む画分と目的物質を含む画分とに分けた。両画分ともにアセトニトリルを留去し、酢酸エチルで抽出、酢酸エチルを留去後凍結乾燥して、それぞれ820mgと107mgの白色粉末を得た。目的物質を含む試料は、さらにHPLC（YMC-Pack D-ODS-S-5カラム、5μm、20x250mm、移動相、アセトニトリル：10mMりん酸二水素カリウム緩衝液 pH3.5=11：9、イソクラティック溶出、1.5ml/min、OD<sub>254nm</sub>）により分取し、同様に脱塩処理を行い、ボレリジン12mg、P-1 59mg、P-2 11mgを純粋な白色粉末として単離した。

#### 【0025】P-1の物理化学的性状

- 1) 融点：88-90℃
- 2) 高分解能EI Mass スペクトル：測定の結果、m/z 489.3087にM<sup>+</sup>が観測され、分子式はC<sub>28</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>であると決定した。質量計算値はm/z 489.3090である。
- 3) <sup>1</sup>H核磁気共鳴スペクトル：図2に示した。
- 4) <sup>13</sup>C核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中での測定結果を表2に示した。

#### 【0026】P-2の物理化学的性状

- 1) 融点：88-91℃
- 2) 高分解能EI Mass スペクトル：測定の結果、m/z 489.3087にM<sup>+</sup>が観測され、分子式はC<sub>28</sub>H<sub>43</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>であると決定した。質量計算値はm/z 489.3090である。
- 3) <sup>1</sup>H核磁気共鳴スペクトル：図3に示した。
- 4) <sup>13</sup>C核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中での測定結果を表2に示した。

#### 【0027】

【表2】

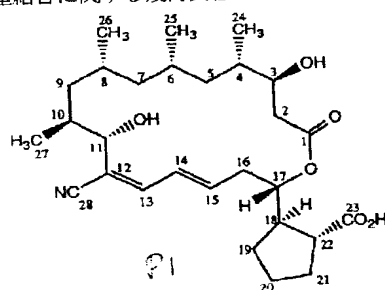
炭素番号	P-1	P-2
	化学シフト値 ( $\delta$ )	化学シフト値 ( $\delta$ )
1	173.5	173.1
2	37.4	37.0
3	71.1	71.1
4	34.6	34.8
5	42.8	43.2
6	26.8	26.8
7	48.2	48.4
8	26.1	25.9
9	37.2	37.0
10	35.6	35.3
11	79.4	72.6
12	115.1	117.8
13	141.1	138.0
14	129.2	123.8
15	139.1	137.3
16	37.9	33.5
17	75.5	75.6
18	48.1	48.5
19	29.8	29.9
20	25.5	25.5
21	31.2	31.2
22	47.1	47.0
23	180.7	180.7
24	18.2	18.2
25	17.6	17.9
26	20.0	19.8
27	15.6	14.8
28	116.0	118.4

【0028】以上の結果から、P-1は下記式(II)で表される、ボレリジンの11位における立体異性体(化合物II)、P-2は下記式(III)で表される、ボレリジンの14および15位の二重結合に関する幾何異性体(化合物

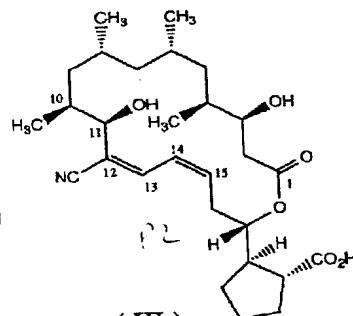
III)であると決定した。

【0029】

【化3】



(II)



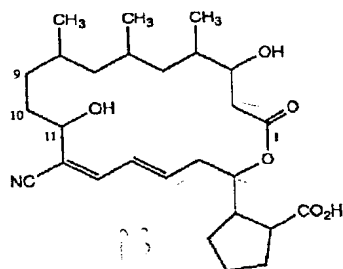
(III)

【0030】実施例3 P-3の分離と構造解析  
図1に記載のHPLC解析クロマトに基づいて、P-3をHPLC-質量分析計(LC-Mass)にて分析した結果、ボレリジンより分子量が14少ない類縁体であり、図4に示すマス

スペクトル及び図5に示すマスマススペクトルの開裂様式より、下記式(IV)で表される10-デスメチルボレリジン(化合物IV)であることが判明した。

【0031】

## 【化4】



## (IV)

## 【0032】実施例4 P-4の単離と構造解析

Mer-N7167 株を、グリセロール2.0 %、酵母エキス0.2 %、コーンステーパーリカー2.0 %および塩化ナトリウム0.3 %からなる培地にて培養し、得られた培養液の一部をそのまま等量の1-ブタノールで抽出し、濃縮乾固して得た粗抽出物を図1と同様の条件でHPLC分析したところ図6に示すごとく、これまでのP-1、2、3とは異なるP-4が存在することが確認された。そこで以下の方法によりP-4を単離した。全培養液15LをpH3に調整し、1-ブタノール10Lを加え、1時間攪拌後遠心分離し、1-ブタノール層を減圧下濃縮乾固した。得られた油状物質を酢酸エチル、水、各々1Lに分配し、酢酸エチル層を分離し、減圧下濃縮乾固して黒褐色油状物質4.8gを得た。次にこの粗抽出物を少量のジメチルスルホキシドに溶解し、YMC-GEL ODS-AM 120-S50のカラム(600ml)に付した。アセトニトリル：10mMリン酸二水素カリウム緩衝液 pH3.5=2：3の混合溶媒2Lで洗浄後、17:25さらに9:11の組成の混合溶媒各2Lで溶出し、溶出液をHPLCでモニターしながら、ボレリジンを含む画分とP-4を含む画分とに分け、脱塩処理後凍結乾燥して、それぞれ617mgと240mgの白色粉末を得た。P-4を含む画分は、さらにシリカゲル60カラム(150ml)に吸着させ、TLC(展開溶媒、クロロホルム：メタノール=4：1、Rf値=0.11)にてモニターしながら、クロロホルム：メタノール=49:1、19:1および4：1の混合溶媒で溶出し、ボレリジンおよびP-4をそれぞれ60mgおよび98mgの純粋な白色粉末として単離した。P-4は、ヘキサン-アセトンの混合溶媒から結晶化し、無色結晶51mgを得た。

## 【0033】P-4の物理化学的性状

1) 融点：108-111℃

2) 高分解能EI Mass スペクトル：測定の結果、 $m/z$ 508.3041に $M^+$ が観測され、分子式は $C_{28}H_{44}O_8$ であると決定した。質量計算値は $m/z$ 508.3036である。

## 3) 紫外吸収スペクトル：

$\lambda_{max}$  MeOH 254nm ( $\epsilon$  14,900)

$\lambda_{max}$  0.01N HCl-MeOH 260nm ( $\epsilon$  15,300)

$\lambda_{max}$  0.01N NaOH-MeOH 249nm ( $\epsilon$  16,500)

4) 赤外吸収スペクトル：臭化カリウム中での拡散反射法による測定結果を図7に示した。

5)  $^1H$ 核磁気共鳴スペクトル：図8に示した。

6)  $^{13}C$ 核磁気共鳴スペクトル：重クロロホルム中での測定結果を表3に示した。

【0034】

【表3】

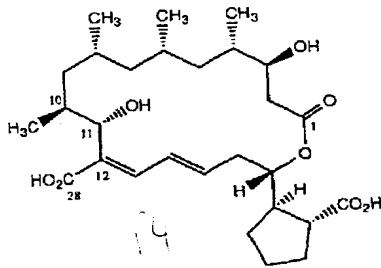
炭素番号	P-4
	化学シフト値 ( $\delta$ )
1	173.8
2	38.8
3	71.4
4	35.5
5	42.8
6	26.2
7	48.3
8	26.7
9	38.7
10	34.5
11	83.5
12	128.7
13	143.1
14	130.2
15	139.8
16	37.1
17	75.0
18	46.3
19	30.2
20	25.7
21	31.6
22	47.9
23	182.6
24	18.3
25	17.7
26	20.1
27	16.2
28	171.4

【0035】以上の結果から、P-4は、P-1の12位のニトリル基がカルボキシル基に置き換わった、式(V)で表されるボレリジン類縁体(化合物V)であると決定した。

【0036】

【化5】





(V)

## 【0037】実施例5. 血管新生阻害活性

ラット大動脈片をコラーゲンゲル内に培養し、観察される管腔形成の阻害度を血管新生阻害活性とした。Sprague-Dawley系雄ラット(8~12週齢)より摘出した大動脈をハンクス液で洗浄しながら周辺の脂肪組織を丁寧に除去した。大動脈を切開し2mm角の切片を作成した後、24ウェルプレート内へ内皮細胞面を上にして静置する。次に、中性化したタイプIコラーゲンゲル(Cellmatrix type I-A:新田ゼラチン)500  $\mu$ lを各ウェルへ注ぎクリーンベンチ内で室温下約20分間放置してゲルを固まらせた。ゲルが固まったことを確認した後500  $\mu$ lのMCDB 131(クロレラ工業社製)培地を各ウェルに加えCO<sub>2</sub>インキュベーター(5%CO<sub>2</sub>)で37℃下培養した。翌日試験検体を含むMCDB 131培地と培養液を交換し、さらに培養4日目に再度試験検体含有のMCDB 131培地と交換して培養を続けた。そして、試験検体添加後7日目の時点で、大動脈の周囲に形成された毛細血管数を顕微鏡を用いて測定した。

【0038】その結果は表4に示すごとく、P-1、P-2、P-4は濃度依存的に血管新生を阻害した。そのIC<sub>50</sub>値はそれぞれ8.4ng/ml、4.4ng/ml、2.8ng/mlであった。なお、阻害活性はサンプル無添加群の毛細血管数との比較で表した。

## 【0039】

【表4】

検体濃度 (ng/ml)	阻害活性 (%)		
	P-1	P-2	P-4
0	0	0	0
0.1	—	—	0
1	0	0	11
3	29	32	—
10	54	90	99
30	89	100	—

—: no test, N = 4

## 【0040】実施例6. 血管内皮細胞に対する増殖抑制作用

ヒト血管内皮細胞(HUVEC:クラボウ)をEGM培地(クラ

ボウ)に30,000cells/mlの濃度で懸濁した後、96ウェルプレート中に100  $\mu$ lずつ添加する。37℃で一晩培養した後に、同じ培地で希釈した検体含有液を各ウェルに100  $\mu$ lずつ添加し3日間培養した。そして、50  $\mu$ lの0.33% MTT液を各ウェルに加えて2-3時間培養した後、培養液を吸引して除いた。次いで、100  $\mu$ lのジメチルスルホキシドを加えて溶解し、540nmの吸光度をプレートリーダーを用いて測定した。阻害濃度は無処理群との比較によって算出した。その結果、P-1、P-2、P-4のIC<sub>50</sub>値はそれぞれ39ng/ml、36ng/ml、10  $\mu$ g/mlであり、前二者に強い増殖阻害作用が確認された。

## 【0041】実施例7. スレオニンtRNA合成酵素阻害作用

スレオニンtRNA合成酵素の調製は以下の方法で行った。

1  $\times$  10<sup>8</sup>個のヒト鼻咽癌(KB)細胞を集めPBSで1回洗浄後、10mlのlysis buffer(10ml Tris HCl pH7.5, 50mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM DTT, 20% glycerol, 1% NP-40)に懸濁し氷冷下30分間放置する。16000rpm(KUBOTA RK-2000T, RA2 rotor)で20分間遠心して得た上清を-20℃で保存した。スレオニンtRNA合成酵素阻害作用の測定は200  $\mu$ lの反応液にて実施した。50mM HEPES pH8.2, 5mM ATP, 2.5mM CTP, 40mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EDTA, 200  $\mu$ g/ml Rabbit liver tRNA, 100  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]Threonine, 100  $\mu$ g/ml酵素溶液に検体を加え30℃で45分間反応を行った。次に、反応液の100  $\mu$ lを2.5mlの冷却しておいた10% TCA溶液に加えてtRNAを沈殿させた。グラスフィルター(φ2.1cm)を用いて沈殿を濾取し、10% TCA(5ml  $\times$  3), EtOH(2ml  $\times$  2)の順に洗浄した。そして、液体シンチレーションカウンターにより沈殿したスレオニン量を測定した。その結果、ボレリジン、P-1およびP-2は酵素阻害作用を示し、そのIC<sub>50</sub>値はそれぞれ0.06  $\mu$ g/ml、0.95  $\mu$ g/ml、0.75  $\mu$ g/mlであった。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で行ったボレリジン画分のHPLC 3C<sub>18</sub>カラムクロマトグラフィーの結果を示す図である。

【図2】重クロロホルム中でのP-1の<sup>1</sup>H核磁気共鳴スペクトルである。

【図3】重クロロホルム中でのP-2の<sup>1</sup>H核磁気共鳴スペクトルである。

【図4】P-3のLC-Mass チャートである。

【図5】P-3のマススペクトル開裂様式を示す図である。

【図6】実施例4で行ったボレリジン画分のHPLC 3C<sub>18</sub>カラムクロマトグラフィーの結果を示す図である。

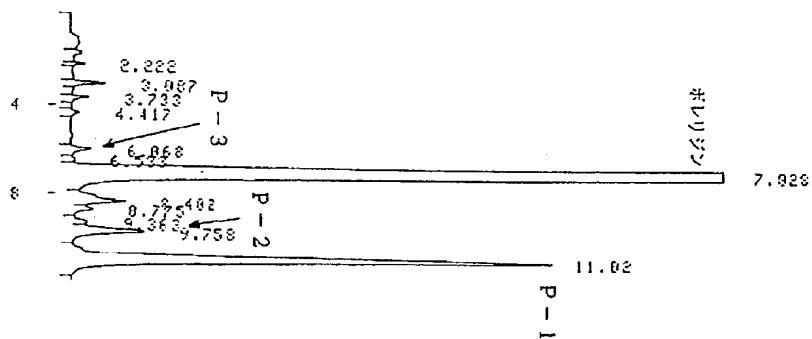
【図7】臭化カリウム中でのP-4の赤外吸収スペクトルである。

【図8】重クロロホルム中でのP-4の<sup>1</sup>H核磁気共鳴スペクトルである。

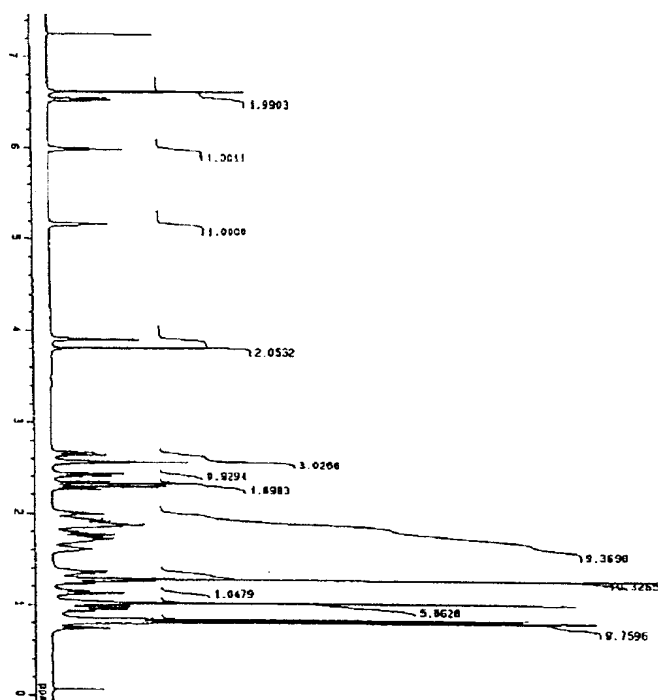
(9)

特開平9-227549

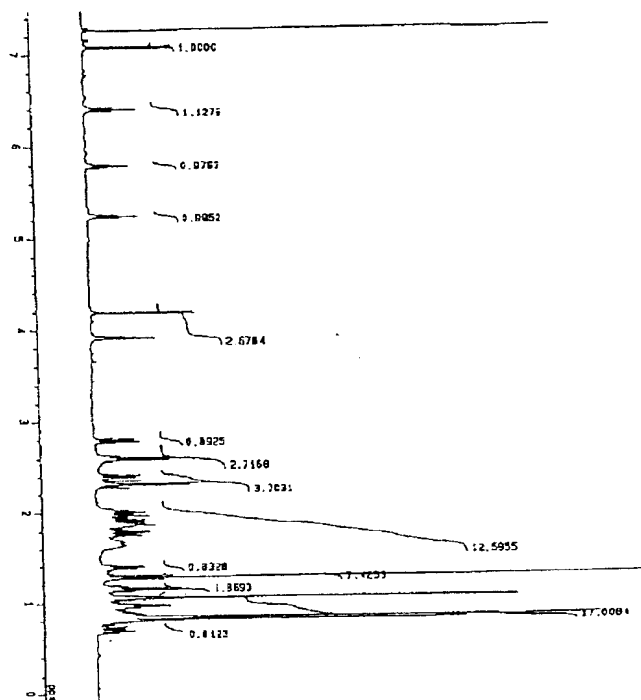
【図1】



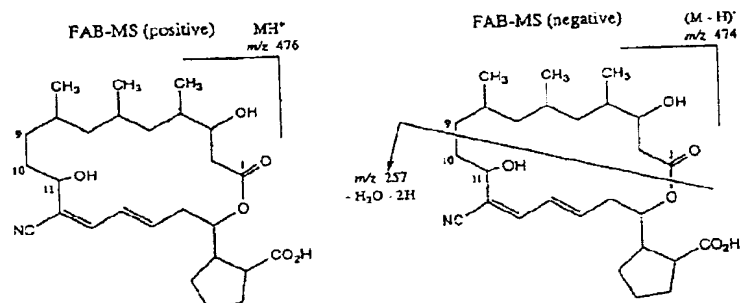
【図2】



【図3】



【図5】

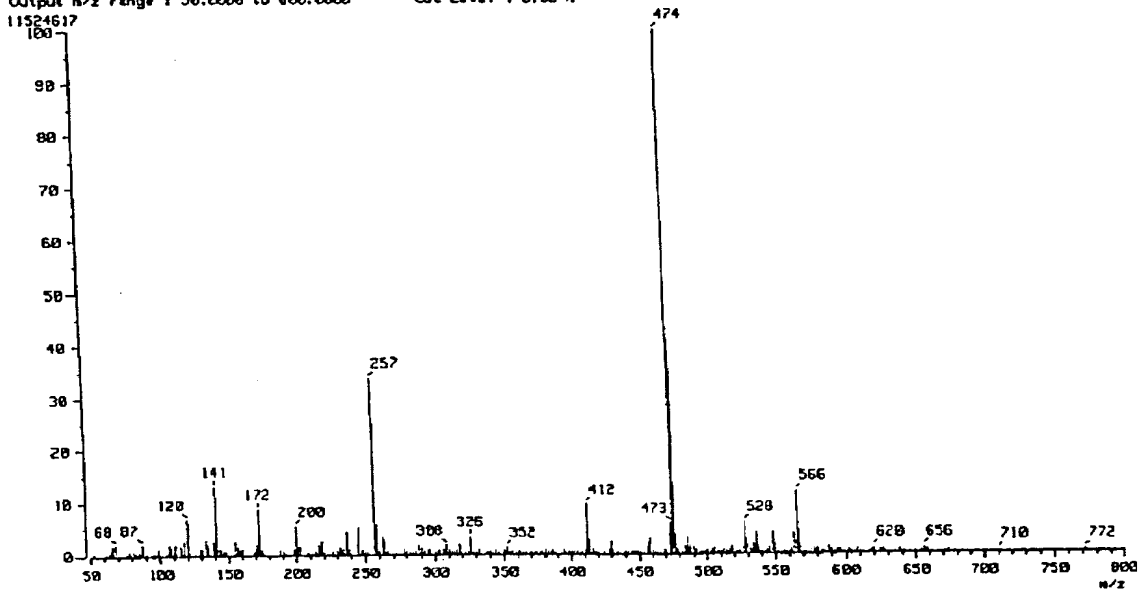


(11)

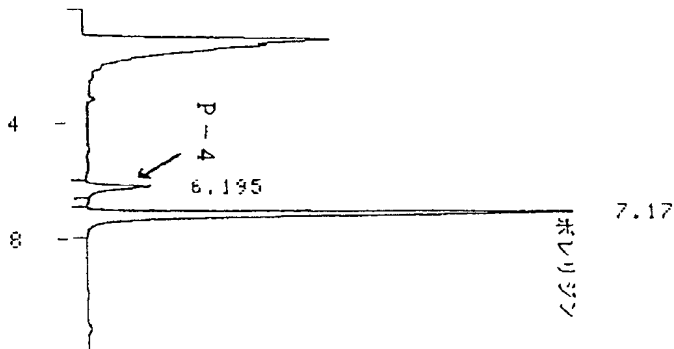
特開平9-227549

【図4】

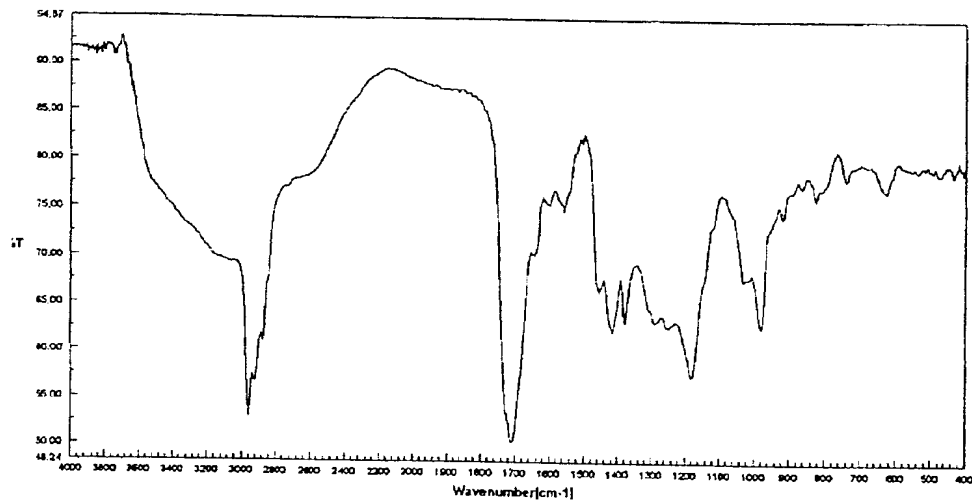
[ Mass Spectrum ]  
Data : Bor.Fr4.Neg Date : 20-Jun-94 10:58  
Sample: RT14min, Fraction4 diluted with water  
Note : 70%MeOH, 20mM O-GC00H, 1%Gly, 20ul/min, split 2kg/cm2  
Inlet : Direct Ion Mode : FAB-  
Spectrum Type : Regular (MF-Linear)  
RT : 14.43 min Scan# : (229,232)-(207,221) Temp : 8.0 deg.C  
BP : m/z 474.0200 Int. : 1095.07  
Output m/z range : 50.0000 to 800.0000 Cut Level : 0.00 %  
11524617



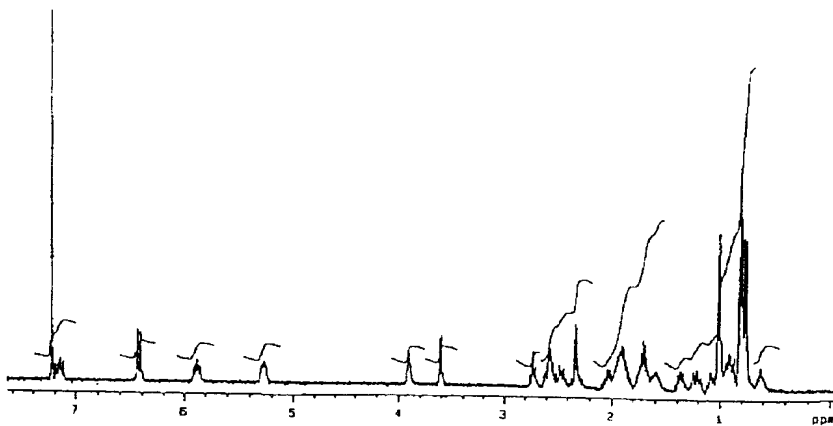
【図6】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/365	A E D		A 6 1 K 31/365	A E D
C 1 2 P 17/08			C 1 2 P 17/08	
//(C 1 2 P 17/08				
C 1 2 R 1:465)				
C 0 7 M 9:00				

(72)発明者 横山 由美  
茨城県新治郡新治村大畑1510-38

(72)発明者 渡辺 吉雄  
神奈川県藤沢市藤が岡2-22-3

( 1 3 )

特開平 9 - 2 2 7 5 4 9

( 7 2 ) 発明者 土橋 和之  
神奈川県秦野市南が丘 3 - 4 - 1 5 -  
204

(19)

(11) publication number: 09227549A

**PUBLISHED UNEXAMINED PATENT APPLICATION**

(21) Application number: 08035082

(51) Int. C07D313/00 A61K 31/365 A61K31/365  
A61K31/365 A61K31/365 A61K31/365  
C12P 17/08

(22) Application date: 22.02.96

<p>(30) Priority (43) Date of application publication: 02.09.97 (84) Designated contracting status:</p>	<p>(71) Applicant: MERIAN CORP EIZAI CO LTD (72) Inventor: WAKABAYASHI TOSHIAKI KAGEYAMA REINA NARUSE YASUAKI YOKOYAMA YUMI WATANABE YOSHIO DOBASHI KAZUYUKI (74) Representative:</p>
---	---

(54) TITLE OF THE INVENTION Novel  
bioactive substance as an angiogenesis  
inhibitor

(57) SUMMARY

OBJECTIVE: To provide a novel angiogenesis  
inhibitor.

METHOD: Four compounds related to Borrelidin  
have been isolated and their structures confirmed  
as the result of screening and purifying  
angiogenesis inhibitors using the culture solution  
of fungus belonging to the genus Streptomyces as  
the raw material.

APPLICATION: It is hoped that the substances  
will be proved effective for prevention of and  
treatment for the diseases with an effect of  
anomalous proliferation of angiogenesis.

## CLAIMS

CLAIM 1: The compound shown in formula (I), salt or hydrate hereof.

[CH. 1]

### DIAGRAM

(I)

(In the formula, R1 represents H or lower alkyl group, R2 cyano group or carboxyl group)

CLAIM 2: The compound referred to in Claim 1 in which R1 is methyl group and R2 is of the cyanogen group that has a configuration of 12Z, 14E in the formula (I), and salt and hydrate hereof

CLAIM 3: The compound referred to in Claim 1 in which R1 is methyl group and R2 is of the cyanogen group that has a configuration of 12Z, 14Z in the formula (I), and salt and hydrate hereof

CLAIM 4: The compound referred to in Claim 1 in which R1 is hydrogen and R2 is cyanogen, and has a configuration of 12Z, 14E, in the formula (I), and salt and hydrate hereof.

CLAIM 5: The compound referred to in Claim 1 in which R1 is methyl group, R2 is of the carboxyl group, and has a configuration of 12Z and 14E in the formula (I), and salt and hydrate hereof.

CLAIM 6: Any medicine that includes in its component, the compound and salt or hydrate hereof referred to in any one of Claims from 1 to 5

CLAIM 7: Any production method of the compound and the salt or the hydrate hereof referred to in any one of Claims from 1 to 5 that is characterised by cultivating *Streptomyces rochei* Mer-N7167 in nutrient medium, and from its solution, collecting the compound and salt or hydrate hereof referred to in any one of Claims from 1 to 5.

## DISCLOSURE OF THE INVENTION:

[0001]

FIELD OF THE INVENTION: This invention is concerned with the effective bioactivator for prevention of and treatment for the diseases with an effect of anomalous proliferation of angiogenesis.

[0002]

PRIOR TECHNOLOGY: Angiogenesis is an essential biological phenomenon in formation of vessel system, or morphological and functional development of various organs in foetus, but in matured body, it appears only in female menstruation period. In matured body, however, anomalous increase of angiogenesis is known to be related to onset or progression of various diseases. Some of the examples are: cancer, rheumatoid arthritis, atherosclerosis, diabetic retinopathy, hemangioma and psoriasis (Marshall et al., *Biotechnology*, 9, 630, 1991). As it has

been reported that proliferation of solid cancer in particular is angiogenesis dependent (Folkman, J., *J. Nat. Cancer Inst.*, 82, 4, 1990), angiogenesis inhibitor presents a new possibility for treatment in intractable solid cancers.

[0003] Whilst a number of reports on angiogenesis inhibitor have been published, no substances that are effective as well as practicable have yet been found (PUBLISHED UNEXAMINED PATENT APPLICATION 03109324, PUBLISHED UNEXAMINED PATENT APPLICATION 03236324A, PUBLISHED UNEXAMINED PATENT APPLICATION 032184A).

[0004]

OBJECTIVES OF THE INVENTION: The objective of this invention is to isolate a novel substance that has the property of angiogenesis inhibitor, and to provide prevention of and treatment for diseases with an effect of anomalous proliferation of angiogenesis.

[0005]

METHODS TO REACH THE OBJECTIVES: In view of the situation above, the inventors began screening in search of a new angiogenesis inhibitor that would be more effective and with less side effects, by using fungus culture solution as the raw material. The result was a discovery that an angiogenesis inhibitor was being produced in the culture solution of fungus in the genus *Streptomyces*, and after the isolation and structure analysis, the substance was identified as Borrelidin. In the purification process of this substance, as the result of HPLC analysis using photodiode array detector, 4 peaks indicating the ultraviolet absorption spectrum identical to Borrelidin were identified. Isolation and structure analysis confirmed that these chemical compounds were novel substances and had angiogenesis inhibition properties. Thus the invention came to its completion.

[0006] In summary, this invention is concerned with the compound represented by the formula (I) and salt and hydrate hereof, their production method, and pharmaceutical products whose components include above mentioned substances.

[0007]

[CH. 2]

### DIAGRAM

(I)

[0008] (In the formula, R1 represents H or lower alkyl group, R2 cyano group or carboxyl group) In more detail, this invention is concerned with; of the formula (I), the compound in which R1 is methyl group, R2 is cyano group that has a configuration of 12Z, 14E (II), the compound in which R1 is methyl group, and R2 is cyano group that has a configuration of 12Z, 14Z (III), the



compound in which R1 is hydrogen and R2 is cyano group that has a configuration of 12Z, 14E (IV), the compound in which R1 is methyl group and R2 is carboxyl group that has a configuration of 12Z, 14E (V), salt or hydrate hereof, production methods of these chemical compounds, and pharmaceutical products whose components include above mentioned substances, and that are effective prevention and treatment of diseases that have an effect of anomalous proliferation of angiogenesis.

[0009] These components are analogue of Borrelidin; Borrelidin was isolated from the cultural solution of fungus in genus *Streptomyces* and structurally determined as an antibiotic in 1949 (Berger, J. et al., Arch. Biochem. Biophys., 22, 476, 1949).

[0010]

STRUCTURE OF IMPLEMENTATION: Genus streptomyces was selected for the fungus culture solution from which the compound of invention herein was extracted. *Streptomyces alvovineus*, *streptomyces rochei* or *streptomyces* sp. C2989, all of which produce Borrelidin, can also be used (Singh, S.K., et al., Antimicrob. Agents. Chemother. 27, 239, 1958; Berger, J. et al., Arch. Biochem. Biophys., 22, 476, 1949; Lumb, M. et al., Nature, 206, 263, 1965). *Streptomyces rochei* ATCC 10739 is one of the examples

*Actinomyces* Mer-N7167 which was separated from the soil of Ishigaki Island by inventors herein has high Borrelidin productivity and is a particularly suitable strain. This fungus strain has following mycological properties.

[0011] Structure: It consists of base hyphae that branch and extend well, and aerial hyphae that also extend well. The tips of aerial hyphae grow into spores. A spore chain is made up with 10-50 individual spores and forms a loose spiral, though some may form a curve. The spores have smooth surface and have diameter of approximately 1 $\mu$ m x 1-2 $\mu$ m.

[0012] Composition of fungus body: It contains LL-type diaminopimelic acid, and its sugar contains galactose, glucose, mannose and ribose.

[0013] Growth on various culture media;

ISP-1 The growth is moderate and produces thin, white aerial hyphae. The underside of culture becomes slightly yellow.

ISP-2 The growth is good and grows grey to greyish white spores in abundance on white aerial hyphae. The underside of culture becomes slightly yellow.

ISP-3 The growth is good and the colour of the spores is greyish purple. The rest is as ISP-2

ISP-4 The colour of the spores is medium grey. The rest is as ISP-2.

ISP-5 The growth is weak and produces some white aerial hyphae.

Variant tyrosine culture medium Melanin pigments are not produced. Few soluble pigments are found in any of the culture medium.

[0014] Saccharolytic feature;

(+) glucose, inositol, fructose, rhamnose, mannose, arabinose

( $\pm$ ) xylose

(-) raffinose, sucrose

(+); react well (-); does not react ( $\pm$ ); in-between

Identification; *Streptomyces rochei* type strain

IFO 12908 was tested at the same time. The

differences in their properties identified are shown in the chart 1.

[0015]

CHART 1

	N 7167	IFO 12908
Length of the spore chains	10-50, not found in over 50	Occasionally found in over 50
Colony colour	Various grey in ISP-2, 3, 4	Various grey in ISP-2, 4
Soluble pigments	Hardly found	A few found in ISP-3

[0016] Whilst some differences existed, these differences were intraspecies within *streptomyces rochei*. On this basis, inventors herein named the fungus strain *Streptomyces rochei* Mer-N7167. This fungus strain was deposited in Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human Technology on 28th of November 1994.

[0017] For screening, angiogenesis inhibitor was measured against the inhibition level of lumen formation. This is observed when a piece of aorta taken from a rat is cultivated in collagen gel (Nicosia, R.F., Lab. Invest., 63, 115, 1990). Anti-proliferation activity and threonine tRNA synthetase inhibition activity on vascular endothelial cells were also measured.

[0018] Fungus in genus *streptomyces* was cultivated in an appropriate routine condition. The culture solution was then clarified and filtered, and extracted by adding organic solvent such as butanol or methyl-isobutylketone, and the organic solvent layer was concentrated under reduced pressure. This was then extracted with methanol, and rough extract was obtained by processing it with light petroleum or a similar substance. Following this, it was divided with any appropriate method such as adsorbent chromatography such as silica gel, LH-20 gel chromatography, partition chromatography, thin-

layer chromatography or paper chromatography, then the active fractions were confirmed by activity screening. Active substances can be isolated by any appropriate combination of the above methods. For the solvent in absorption chromatography, organic solvent that are normally used, such as chloroform, methanol, acetone, hexane, toluene are used by selecting an appropriate concentration and combination. For crystallising solvent, any combination of chloroform, hexane, acetone, carbon tetrachloride can be appropriately selected. An example is the method used by M. Lamb (Nature, 206, 236, 1965). For structure analysis of the isolated compound, the routine methods such as elemental analysis, GC-MS, NMR, melting point, ultraviolet, infrared absorption spectrum can be used.

[0019] On the basis that invented chemical compound herein possesses powerful angiogenesis inhibitor, it is expected to be used as medicine for prevention for and treatment of diseases in which anomalous angiogenesis is observed, such as rheumatoid arthritis, solid cancer, atherosclerosis, diabetic retinopathy, hemangioma and psoriasis.

[0020] To administer chemical compound hereof, it can be done so orally as tablets, powder, granule, capsules or syrup. It can also be administered non-orally as aerosol, suppository, injection, external medicine or drip. Whilst the dosage will vary greatly according to the degree of the symptoms, the age and the type of hepatopathy, normal dosage for an adult will be 1mg-100mg once to several times per day.

[0021] For manufacturing, the normal method using the regular pharmaceutical carrier can be employed. This is as follows; for solid product for oral administration, add diluting agent to the base component, and if necessary, also add bonding agent, degrading agent, lubricant, colouring and taste and smell rectifier, then by the regular manufacturing methods, it can be made into tablets, coated tablets, granule, powder or capsules. These tablets and granule may, if necessary, be appropriately coated by saccharine or gelatine coating. Injection can be manufactured by adding pH modifier, buffer agent, stabiliser and solubiliser to the base agent, then made into hypodermic, muscle and vein internal injection by the normal method.

[0022]

#### EXAMPLES OF IMPLEMENTATION

In the following section, the invention is described in detail. The examples are, however by no means exhaustive. All % in the examples are weight based unless otherwise stated

#### [0023] Experiment 1. Purification method.

The seed medium consisted of glycerol 2.0%, glucose 2.0%, soy powder 2.0%, yeast extract 0.5%, sodium chloride 0.25%, calcium carbonate 0.32% and a trace of metal solution (prepared with copper sulphate 0.25%, manganese chloride 0.25% and zinc sulphate 0.25%) 0.2%. For the production culture medium, the same components were used as for the seed medium, except for replacing glycerol 2.0% with potato starch 2.0%. Anti-foaming agent 0.05% was added to the jar culture. Pre-sterilisation pH was 7.4. 100ml of the aforementioned seed culture was distributed into 500ml Erlenmeyer flasks which were then sterilised for 15 minutes at 150C°, into which 1platinum loop from Mer-N 7167 strain on slant agar medium was inoculated. This was shake cultured for 3 days at 28 C° and used as seed culture. 15L production medium was poured into two 30L fermenting jars, sterilised at 120C° for 20 minutes, 100 ml of seed culture was inoculated into each jar, then the media were incubated for 5 days at 28C° with aeration (0.5vvm) and agitation (300rpm). When the cultivation was completed, it was centrifuged and the filtrate was collected, which was then adjusted to pH7, adsorbed onto Diaion HP-20 (manufactured by Mitsubishi Kasei) with which column was filled. This was washed with water and with 20% methanol, and was eluted by 80% acetone. Approximately 30L of the elute was concentrated under reduced pressure to remove the acetone, to which water was added to make the total volume of approximately 1L, then two extractions were made with 80% ethyl acetate. Dark brown oily substance was obtained by concentrating, drying and solidifying the extract under reduced pressure. This oily substance was dissolved in a small amount of methanol, placed on the upper part of Sephadex LH-20 (manufactured by Pharmacia Biotec) column (400ml) and expanded by methanol, and then the active fractions were concentrated, dried and solidified. Next, it was dissolved in a small amount of chloroform: methanol = 50:1, placed on a silica gel 60 (manufactured by Merck & Co.) column and eluted with chloroform: methanol = 50:1, 20:1 and 10:1, each measuring 500ml. Active fractions which were eluted with chloroform: methanol = 50:1 ~ 20:1 were collected, then concentrated, dried and solidified. Next, it was dissolved in acetone, mixed with a little silica gel 60, concentrated, dried and solidified under reduced pressure, placed on the upper part of silica gel 60 column (150ml), and eluted with hexane: acetone = 3:1, 2:1 and 1:2, each measuring 500ml. The active fractions eluted with hexane: acetone = 3:1 ~ 2:1

were collected, and concentrated, dried and solidified under reduced pressure. This sample was dissolved in a small amount of toluene: acetone = 5: 1, placed on the upper part of silica gel 60 column (50ml) and eluted with toluene: acetone = 5: 1, 4: 1 and 2:1 each measuring 200ml. The active fraction which was eluted with toluene: acetone = 5: 1 was collected, and concentrated, dried and solidified under reduced pressure. When this sample was analysed by COSMOSIL 3C18 column (3\_m, 4.6 x 100mm) and photodiode array detector, as shown in Figure 1, 3 peaks were identified showing ultraviolet absorption spectrum identical to that of Borrelidin (referred to as P-1, P-2, P-3), (mobile phase: acetonitrile: 10mM potassium dihydrogen phosphate buffer solution, pH3.5 = 1:1, isocratic elute, 1m 1/min, OD254nm). The main peak in Figure 1 is Borrelidin.

[0024] Experiment 2 Purification and structural determination of P-1 and P-2

170L of the tank culture liquid of Mer-N7167 strain was centrifugal processed and 140L of the supernatant was collected, which was then adjusted to pH7 and adsorbed to 7L of Diaion HP-20 HP-20 resin was collected, poured into a column, washed with water, then eluted with 20L of 80% acetone water. The elute was concentrated under reduced pressure to remove the acetone and water was added to make the total volume of 4L, then it was extracted twice with 4L of ethyl acetate. Together with ethyl acetate phase, it was concentrated, dried and solidified under reduced pressure, from which 27g of dark brown oily substance was obtained. Sephadex LH-20 column was prepared with methanol, to which the oily substance was attached and expanded with methanol. Monitoring this with TCL (silica gel 60 manufactured by Merck & Co., No. 5715, expansion solution: chloroform: methanol = 9: 1, sulphuric acid colouring, Rf value 0.42), the fractions that contain Borrelidin were collected and, concentrated, dried and solidified. The sample obtained was adsorbed onto a silica gel 60 column (750ml), washed with 2L of chloroform, eluted with chloroform: methanol = 49: 1 and 19: 1 each measuring 2.5L, and fractions that contained Borrelidin were collected which were then concentrated, dried and solidified. The sample obtained was also adsorbed onto silica gel 60 (750ml) column, washed with 2L of hexane: acetone = 4: 1, eluted with mixed solvent of 7: 3 of the same components. 5.95g of purified substance was obtained by collecting Borrelidin contained

fractions, and concentrating, drying and solidifying them. 4.29g of Borrelidin colourless needle crystal was obtained by crystallising this purified substance, which was bioactive, from mixed solvent of chloroform-hexane. After concentrating, drying and solidifying the mother liquor (1.58g), it was dissolved into a small amount of dimethylsulfoxide, then placed in a YMC-GEL ODS-AM 120-S50 (manufactured by YMC, 600ml) column which was prepared with acetonitrile: 10mM potassium dihydrogen phosphate buffer solution. It was washed in 2L of mixed solvent of the equal composition, eluted in 2L of mixed solvent of composition 9:11 then 1:1, and under HPLC monitor, the elute was separated into pure Borrelidin contained fractions and the specified substance. Acetonitrile was removed from both fractions which were then extracted with ethyl acetate, when ethyl acetate was removed, it was freeze dried. From each fraction, 820mg and 107mg of white powder was obtained. The sample that contained the specified substance was further separated with HPLC (YMC-Pack D-ODS-S-5 column, 5\_m, 20x250mm, mobile phase, acetonitrile: 10mM potassium dihydrogen phosphate buffer solution pH3.5 = isocratic elute, 15ml/min, OD254nm), de-salted with the same process. From this 12mg of Borrelidin, 59mg of P-1, 11mg of P-2 were isolated in a form of pure white powder.

[0025] Physiochemical property of P-1

- 1) melting point: 88-90°C
- 2) high resolution EI Mass spectrum: M+ was measured at m/z489.3087, and the molecular formula was determined as C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>6</sub>. The mass calculated value is m/z489.3090
- 3) <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectrum: shown in Figure3
- 4) <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectrum: measured in multiple chloroform and the result is shown in table2.

[0026] Physiochemical property of P-2

- 5) melting point: 88-91°C
- 6) high resolution EI Mass spectrum: M+ was measured at m/z489.3087, and the molecular formula was determined as C<sub>28</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>6</sub>. The mass calculated value is m/z489.3090
- 7) <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectrum: shown in Figure3\*
- 8) \*<sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectrum: measured in multiple chloroform and the result is shown in table2

[0027]  
TABLE2

Carbon number	P-1	P-2
	Chemical shift value ( )	Chemical shift value( )
1	173.5	173.1

2	37.4	37.0
3	71.1	71.1
4	34.6	34.8
5	42.8	43.2
6	26.8	26.8
7	48.2	48.4
8	26.1	25.9
9	37.2	37.0
10	35.6	35.3
11	79.4	72.6
12	115.1	117.8
13	141.1	138.0
14	129.2	132.8
15	139.1	137.3
16	37.9	33.5
17	75.5	75.6
18	48.1	48.5
19	29.8	29.9
20	25.5	25.5
21	31.3	31.2
22	47.1	47.0
23	180.7	180.7
24	18.2	18.2
25	17.6	17.9
26	20.0	19.8
27	15.6	14.8
28	116.0	118.4

[0028] From the result above, it was determined that P-1 is a stereoisomer (chemical compound II) at Borrelidin 11<sup>th</sup>, represented by the formula below (II), and P-2 is a geometric isomer (chemical compound III) related to double bond at Borrelidin 14 and 15<sup>th</sup>, represented by the formula (III) below.

[0029]

[CH.3]

#### DIAGRAM

(II) (III)

[0030] Experiment 3 Isolation and structure analysis of P-3

Base on HPLC chromatogram shown in Figure 1, P-3 was analysed by HPLC mass spectrometer (LC-Mass). The result shows that it is a Borrelidin analogue but with 14 less molecules. From the mass spectrum of Figure 4 and the cleavage form of mass spectrum shown in Figure 5, it was identified as 10 -desmethylBorrelidin (chemical compound IV).

[0031]

[CH 4]

#### DIAGRAM

(IV)

[0032] Experiment 4 Isolation and structure analysis of P-4

Mer-N7167 strain was cultivated in a medium

composed of 2.0 % glycerol, 0.2 % yeast extract, 2.0% cornsteep liquor, and 0.3% sodium chloride. A part of the solvent obtained was eluted in its form with the equal amount of butanol, and the rough extract obtained by concentrating, drying and solidifying was then HPLC analysed under the same condition as the Figure 1. As shown in Figure 6, the existence of P-4, which differed from the previously known P-1, 2, 3 was identified. Following this result, P-4 was isolated with the method below. All 15L of culture solution was prepared to pH3, 10L of 1-butanol was added. It was then centrifuged for an hour, and 1-butanol layer was concentrated, dried and solidified under reduced pressure. The oily substance obtained was distributed into 1L of ethyl acetate and 1L of water, then ethyl acetate layer was separated, and concentrated, dried and solidified, which resulted in producing 4.8g of dark brown oily substance. This substance was dissolved into dimethylsulfoxide and placed on YMC-GEL ODS AM 120-S50 column (60ml). After being washed in 2L of mixed solvent composed of acetonitrile: 10mM potassium dihydrogen phosphate buffer solution, pH3.5 = 2: 3, it was eluted with the mixed solvent composed of 17: 25 then 9:11, both 2L. The elute solution was separated into pure Borrelidin contained fractions and P-4 contained

fractions under HPLC monitor, then it was de-salted and freeze dried, which resulted in producing 617mg and 240mg of white powder. The fractions containing P-4 were then adsorbed in silica gel 60 column (150ml), eluted with mixed solvent of chloroform: methanol = 49:1, 19:1 and 4:1 under TLC monitoring (expansion solvent, chloroform: methanol = 4:1, Rf value=0.1). This resulted in isolation of P-4 and bolerridin in pure white powder form, weighing 60mg and 98 mg respectively. P-4 was crystallised with mixed solvent of hexane-acetone, from which 51mg of colourless crystal was obtained.

[0033] Physiochemical properties of P-4

- 1) melting point: 108-111C°
- 2) high resolution EI mass spectrum:  
m/z508.3041 was observed, and molecular formula was determined as C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>8</sub>. The mass calculated value is m/z508.3036.
- 3) ultraviolet absorption spectrum:  
\_max MeOH 245nm (ε<sub>15,300</sub>)  
\_max 0.01N HCl-MeOH 260nm (ε<sub>15,300</sub>)  
\_max 0.01N NaOH-MeOH 249nm (ε<sub>16,500</sub>)
- 4) infrared absorption spectrum: the result of the measurement by diffuse reflectance method in potassium bromide is shown in Figure 7
- 5) <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectrum:  
shown in Figure 8
- 6) <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectrum:  
measurement result in multiple chloroform is shown in Table 3.

[0034]

TABLE 3

[TABLE S]

Carbon number	P-4
	Chemical shift value ( )
1	173.8
2	38.8
3	71.4
4	35.5
5	42.8
6	26.2
7	48.3
8	26.7
9	38.7
10	34.5
11	83.5
12	128.7
13	143.1
14	130.2
15	139.8
16	37.1
17	75.0
18	46.3
19	30.2
20	25.7
21	31.6
22	47.9
23	182.6
24	18.3
25	17.7
26	20.1
27	16.2
28	171.4

[0035] From the result above, P-4 was identified as a Borrelidin analogue (chemical compound V) that has an equation (V), in which nitrile group of 12<sup>th</sup> in P-1 is replaced by carboxyl group.

[0036]

[CH. 5]

#### DIAGRAM (V)

[0037] Experiment 5. Angiogenesis inhibition activity

A piece of aorta from a rat was cultivated in collagen gel, and the inhibition level of lumen formation observed was defined as angiogenesis inhibition activity. A part of aorta removed from a male Sprague-Dawley rat (8-12 week old) was washed with Hanks' solution, and the surrounding fat tissue was carefully removed. The aorta was incised and made into 2mm x 2mm squares which were fixed inside a 24-well plate with endothelial cells face up. Then 500  $\mu$ l of neutralised type I collagen gel (Cell matrix type I-A, Nitta gelatine) was poured into each well. This was left in a clean bench at room temperature for approximately 20 minutes until the gel solidified. When the gel was

solidified completely, 500  $\mu$ l of MCDB 131 culture medium (manufactured by Chlorella Kogyo) was added to each well and cultivated in a CO<sub>2</sub> incubator at 37°C. On the following day, the MCDB 131 culture medium and the culture solution was changed with fresh MCDB131 culture medium containing the samples. On the fourth day, it was again changed with MCDB 131 culture medium containing the test samples, and the cultivation was continued. On the 7<sup>th</sup> day from adding the test samples, the number of capillaries that had formed around aorta was counted under the microscope.

[0038] As shown in Table 4, the angiogenesis inhibition of P-1, P-2, P-4 was concentration dependent. Their IC<sub>50</sub> values were 8.4ng/ml, 4.4ng/ml and 2.8ng/ml respectively. The inhibition activities were shown in comparison with a control group to which no samples were added.

[0039]

TABLE 4

Sample concentration (ng/ml)	Inhibition (%)		
	P-1	P-2	P-4
0	0	0	0
0.1	-	-	0
1	0	0	11
3	29	32	-
10	54	90	99
30	89	100	-

-: not tested, N = 4

[0040] Experiment 6. Proliferation inhibiting activity on vascular endothelial.

Human vascular endothelial (HUVEC: Kurabo) was suspended in EGM culture medium (Kurabo) at the concentration of 30,000 cells/ml, then 100  $\mu$ l was added into each well of a 96-well plate. This was cultivated overnight at 37°C, then 100  $\mu$ l of the liquid containing the samples which was diluted with the same culture medium was added to each well and cultivated for 3 days. After 50  $\mu$ l of 0.33% MTT liquid was added to each well and cultivated for 2-3 hours, the culture solution was removed by suction. Then it was dissolved by adding 100  $\mu$ l of dimethylsulfoxide, and the absorbance of 540nm was measured with a plate reader. The inhibition concentration was measured against an unprocessed group. The result shows that IC<sub>50</sub> values of P-1, P-2, P-4 are 39ng/ml, 36ng/ml and 10  $\mu$ g/ml respectively. Strong proliferation inhibition activity was identified in the first two.

[0041] Experiment 7. Threonine tRNA synthetase inhibition activity

Threonine tRNA synthetase was prepared as below.

1 x 10<sup>8</sup> of rhinopharyngea (KB) cells were

collected and washed once with PBS, then resuspended in 10ml of lysis buffer (10ml Tris-HCl pH7.5, 50mM KCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM DTT, 20% glycerol, 1% NP-40) and left on ice for half an hour. It was centrifuged at 16000rpm (Kubota RK-2000T, RA2 rotor) for 20 minutes, then the supernatant was collected and preserved at -20C°. Threonine tRNA synthetase inhibition activity was measured with 200  $\mu$ l of reaction liquid. The samples were added to 50mM HEPES pH8.2, 5mM ATP, 2.5mM CTP, 40mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EDTA, 200  $\mu$ g/ml rabbit liver tRNA, 100  $\mu$ M 2H-labelled threonine, 100  $\mu$ g of enzyme solution and the reaction was observed at 30C° for 45 minutes. 100  $\mu$ l of the reaction liquid was then added to 2.5ml of the pre-chilled 10% TCA solution and tRNA was precipitated. The precipitate was collected on a glass filter (2.1cm) and washed with order of 10% TCA (5ml  $\times$  3), and subsequently with EtOH (2ml  $\times$  2). Then the quantity of precipitated threonine was measured by a liquid scintillation counter. The result indicated that Borrelidin, P-1 and P-2 possessed enzyme inhibitor, and their IC<sub>50</sub> values were 0.006  $\mu$ g/ml, 0.95  $\mu$ g/ml and 0.75  $\mu$ g/ml respectively.

#### BRIEF EXPLANATION OF FIGURES

**Figure1** shows the result of HPLC 3C18 column chromatography of Borrelidin fractions in Example 1.

**Figure2** shows <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectrum of P-1 in multiple chloroform.

**Figure3** shows <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectrum of P-2 in multiple chloroform.

**Figure4** shows LC-Mass chart of P-3

**Figure5** shows the mass spectrum cleavage form of P-3

**Figure6** shows the result of HPLC 3C18 column chromatography of Borrelidin fractions in Example 4

**Figure 7** shows infrared absorbent spectrum of P-4 in potassium bromide.

**Figure8** <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectrum of P-4 in multiple chloroform.

Translators note:

Original document from page 9 to page 12 show Figures 1 to 8. The Japanese characters in these pages are 'Borrelidin'. Page 12 and 13 shows the information related to the application form, most of which is shown in the first page. The inventors' addresses are not translated.



2 - /pn jp9227549 - 1

\*\* SS 2: Results 1

Doc. on ss 2 using fu with image

• MERCIAN CORP; EISAI CO LTD

Intl. class: C07D-313/00

JP 09227549

Title: NEW PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCE

Application: JP03508296 19960222 [1996JP-0035082]

Abstract:

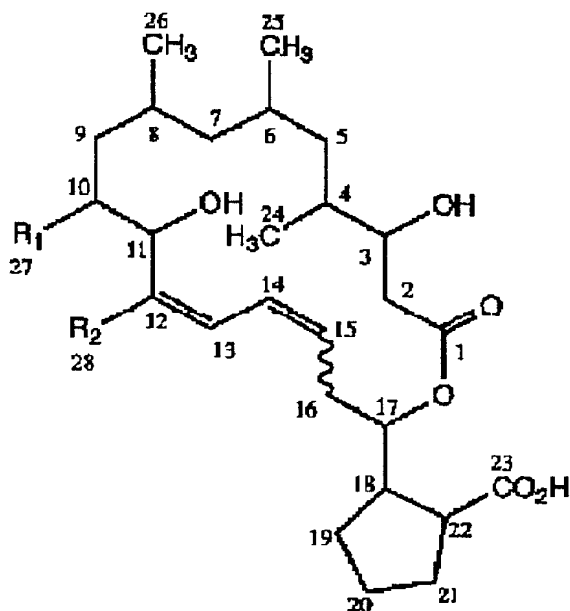
PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new compound useful for preventing and treating various diseases followed by abnormal proliferation of vascularization.

SOLUTION: This compound is shown by formula I (R(sub 1) is H or a lower alkyl; R(sub 2) is cyano or carboxyl), its salt or its hydrate. The compound is obtained by culturing a bacterium belonging to the genus Streptomyces such as Streptomyces rochei Mer-N7167 (FERM P-14670) in a nutrient medium, subjecting the culture solution to clarifying filtration, extracting the solution with a solvent (e.g. butanol), concentrating the organic solvent layer under reduced pressure, extracting the concentrated solution with methanol and purifying the extract by chromatography, etc. The compound is effective for rheumatic arthritis, solid carcinoma, atherosclerosis, diabetic retinopathy, hemangioma, psoriasis, etc. A daily dose is 1-100mg per adult and administered once to several time dividedly.

COPYRIGHT: (C) 1997, JPO

Inventor(s) :

WAKABAYASHI TOSHIAKI; KAGEYAMA REINA; NARUSE YASUAKI; YOKOYAMA YUMI; WATANABE YOSHIO; DOBASHI KAZUYUKI



Other fields:

Pub. N°

JP 09227549 A 19970902 [JP09227549]

Applicant

MERCIAN CORP; EISAI CO LTD

Additional IPC

A61K-031/365 A61K-031/365 A61K-031/365 A61K-031/365 A61K-031/365  
C12P-017/08

ICA

C07M-009:00

ICL

C12P-017/08 C12R-001:465

st en